

DIN EN ISO 16140-2



ICS 07.100.30

Mit DIN EN ISO 16140-1:2016-11
Ersatz für
DIN EN ISO 16140:2011-12

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen
(urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines
Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016);
Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016**

Microbiology of the food chain –
Method validation –

Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference
method (ISO 16140-2:2016);
German version EN ISO 16140-2:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Validation des méthodes –

Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à
une méthode de référence (ISO 16140-2:2016);
Version allemande EN ISO 16140-2:2016

Gesamtumfang 84 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16140-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“, Unterkomitee SC 9, „Microbiology“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“, Arbeitsgruppe 6 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-12 AA "Validierung mikrobiologischer Verfahren" im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133
ISO 16140-1	siehe DIN EN ISO 16140-1
ISO 16297	siehe DIN EN ISO 16297
ISO/TS 22117	siehe DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 16140:2011-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Inhalt der Norm in mehrere Teile aufgeteilt und überarbeitet;
- b) dieser Teil enthält die Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen Verfahren anhand eines Referenzverfahrens;
- c) Norm redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 16140: 2003-09, 2011-12

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser - Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 16140-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 1: Terminologie*

DIN EN ISO 16297, *Milch — Bestimmung der Gesamtkeimzahl — Protokoll für die Bewertung alternativer Verfahren*

DIN CEN ISO/TS 22117, DIN SPEC 91215, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Spezielle Anforderungen und Anleitungen an die Eignungsprüfung durch Ringversuche*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Verfahrensvalidierung —
Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung
von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren
anhand eines Referenzverfahrens
(ISO 16140-2:2016)

Microbiology of the food chain —
Method validation —
Part 2: Protocol for the validation of alternative
(proprietary) methods against a reference method
(ISO 16140-2:2016)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Validation des méthodes —
Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes
alternatives (commerciales) par rapport à
une méthode de référence
(ISO 16140-2:2016)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 12. Mai 2016 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung alternativer Verfahren	7
5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung	8
5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung	8
5.1.1 Allgemeine Betrachtungen	8
5.1.2 Paarweise oder nicht paarweise Untersuchung	8
5.1.3 Untersuchung zur Empfindlichkeit	9
5.1.4 Untersuchung zur relativen Nachweisgrenze	14
5.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und zur Exklusivität	16
5.2 Ringversuch	18
5.2.1 Allgemeine Betrachtungen	18
5.2.2 Untersuchungsvorschrift	18
5.2.3 Berechnungen und Zusammenfassung der Daten	20
5.2.4 Auswertung der Daten	23
6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung	25
6.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung	25
6.1.1 Allgemeine Betrachtungen	25
6.1.2 Untersuchung zur relativen Richtigkeit	26
6.1.3 Untersuchung zum Genauigkeitsprofil	30
6.1.4 Untersuchung zur Bestimmungsgrenze	35
6.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität	35
6.2 Ringversuch	37
6.2.1 Allgemeine Betrachtungen	37
6.2.2 Untersuchungsvorschrift	37
6.2.3 Berechnungen, Zusammenfassung und Auswertung von Daten	38
Anhang A (informativ) Einteilung von Probenarten und vorgeschlagene angestrebte Kombinationen für Validierungsuntersuchungen	43
A.1 Allgemeines	43
Anhang B (normativ) Bevorzugte Reihenfolge für die Verwendung von natürlich und künstlich kontaminierten Proben in Validierungsuntersuchungen	57
Anhang C (informativ) Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Kontamination durch Mischen und die künstliche Kontamination von Lebensmitteln	58
C.1 Allgemeines	58
C.2 Kontamination durch Mischen	58
C.3 Künstliche Kontamination von Lebensmitteln unter Anwendung der Arbeitsvorschrift für das Beimpfen	58

C.3.1	Künstliche Kontamination von Lebensmitteln mit hohem Feuchtegehalt mit einer flüssigen Kultur (Bouillon)	58
C.3.2	Künstliche Kontamination von Lebensmitteln mit geringem Feuchtegehalt mit einer lyophilisierten Kultur	59
C.4	Künstliche Kontamination von Lebensmitteln unter Anwendung der Arbeitsvorschrift für das Aufstocken	60
Anhang D (informativ) Modelle für <i>RLOD</i> -Berechnungen unter Verwendung der Daten aus der Verfahrenvergleichsuntersuchung		61
D.1	Allgemeines	61
D.2	Unbekannte Konzentrationen der Kontamination	62
D.3	Bekannte Konzentrationen der Kontamination, Schätzung von <i>RLOD</i> mittels <i>LOD</i>	62
Anhang E (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität zu berücksichtigende Aspekte		63
E.1	Allgemeines	63
E.2	Kategorien von Zielgruppen	63
E.3	Auswahl der Zielgruppe für eine Untersuchung zur Inklusivität	63
E.4	Auswahl der Nicht-Zielgruppen für eine Untersuchung zur Exklusivität	64
Anhang F (informativ) Betrachtungen zu Berechnungen der relativen Nachweisgrenze (<i>RLOD</i>) zwischen Laboratorien, erhalten in einem Ringversuch		65
Anhang G (informativ) Prinzip des Genauigkeitsprofils für die Validierung von quantitativen Modellen		69
G.1	Annahmekriterium	69
G.2	Zugewiesener Bezugswert	69
G.3	Anteilsbereich	69
G.4	Prinzipien des Genauigkeitsprofils	70
Anhang H (informativ) Anwendung des Genauigkeitsprofils in der Verfahrenvergleichsuntersuchung		71
Anhang I (informativ) Beispiel für die Anwendung des Genauigkeitsprofils bei einem Ringversuch		75
Literaturhinweise		80

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16140-2:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Januar 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2017 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 16140:2003.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16140-2:2016 wurde vom CEN als EN ISO 16140-2:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34 „Food products“, Unterkomitee SC 9, „Microbiology“.

Diese erste Ausgabe der ISO 16140-2, zusammen mit der ISO 16140-1, annulliert und ersetzt die Ausgabe ISO 16140:2003, die fachlich überarbeitet wurde.

ISO 16140 besteht unter dem Haupttitel *Microbiology of the food chain — Method validation* aus den folgenden Teilen:

- *Part 1: Vocabulary*
- *Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*

Die folgenden Teile sind in Vorbereitung:

- *Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory (to be published)*
- *Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation (to be published)*
- *Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation of non-proprietary methods (to be published)*
- *Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing (to be published)*

Einleitung

Derzeit bestehen viele alternative, zum Großteil urheberrechtlich geschützte, Verfahren, die der Beurteilung der mikrobiologischen Qualität von Rohstoffen und Endprodukten und des mikrobiologischen Zustands von Herstellungsverfahren dienen. Diese Verfahren sind oft schneller und leichter durchzuführen als die entsprechenden genormten Verfahren. Die Entwickler, Endanwender und Behörden benötigen eine zuverlässige allgemeine Arbeitsvorschrift für die Validierung solcher alternativer Verfahren. Die gewonnenen Daten werden den potenziellen Endanwendern außerdem Leistungsdaten für ein gegebenes Verfahren liefern und sie somit in die Lage versetzen, eine fundierte Entscheidung über die Annahme eines bestimmten Verfahrens zu treffen. Die gewonnenen Daten können auch als Grundlage für die Zertifizierung eines Verfahrens durch eine unabhängige Organisation dienen.

Dieser Teil von ISO 16140

- ist dafür vorgesehen, eine spezielle Arbeitsvorschrift und Leitlinien für die Validierung urheberrechtlich geschützter Verfahren bereitzustellen, die dafür bestimmt sind, als schnell und/oder leichter durchführbare Verfahren im Vergleich zum entsprechenden Referenzverfahren angewendet zu werden,
- kann auch zur Validierung anderer, nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren angewendet werden, die anstelle des Referenzverfahrens eingesetzt werden,
- ist als Nachfolgedokument für die in der ersten Version von ISO 16140 (ISO 16140:2003) veröffentlichte Arbeitsvorschrift für die Validierung vorgesehen,
- wurde hauptsächlich für die Validierung von Verfahren geschrieben, die in der Lage sind, die Zielkeime zu kultivieren, kann aber auch auf Verfahren für Mikroorganismen angewendet werden, die nicht kultiviert werden können, so wie z. B. Viren (z. B. Norovirus) und protozoische Parasiten (z. B. Kryptosporidien (*Cryptosporidium*) oder Giardien (*Giardia*)). In diesen Fällen sind einzelne Formulierungen so auszulegen, dass sie an die Umstände bei nicht-kultivierbaren Organismen angepasst sind.

Die Anwendung dieses Teils von ISO 16140 schließt Fachwissen in den entsprechenden Bereichen, wie z. B. Mikrobiologie, statistische Planung und Auswertung, ein, wie es in den betreffenden Abschnitten angegeben ist. Das statistische Fachwissen umfasst einen Überblick über die Probenahmetheorie und die Versuchsplanung, die statistische Auswertung von (qualitativen und quantitativen) mikrobiologischen Daten und einen Überblick über die statistischen Begriffe zur Zufallsprobenahme, Heterogenität von Proben, Stabilität von Proben, Versuchsplanung und zu Varianzkomponenten.

Wenn dieser Teil von ISO 16140 das nächste Mal überprüft wird, werden sämtliche Informationen berücksichtigt werden, die dann in Bezug darauf, inwieweit die Leitlinien eingehalten wurden, und in Bezug auf die Gründe für Abweichungen davon im Fall bestimmter Produkte zur Verfügung stehen.

Die Harmonisierung von Validierungsverfahren kann nicht umgehend erfolgen und für bestimmte Gruppen von Produkten bestehen möglicherweise bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen, die diesem Teil von ISO 16140 nicht entsprechen. Es besteht die Hoffnung, dass derartige Normen, wenn sie überprüft werden, so geändert werden, dass sie ISO 16140 soweit entsprechen, dass die einzigen zum Schluss verbleibenden Abweichungen von diesem Teil von ISO 16140 diejenigen sind, die aus gängigen technischen Gründen notwendig sind. Zum Beispiel behandelt ISO 16297 [3] eine sehr spezifische Validierung für einen spezifischen Gegenstand (den Hygienestatus von Rohmilchproben) und wird als eine vertikale Norm neben ISO 16140 bestehen bleiben. Wenn eine derartige Validierung notwendig ist, ist die vertikale Norm bedeutender.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16140 legt das allgemeine Prinzip und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer, zum Großteil urheberrechtlich geschützter, Verfahren in der Mikrobiologie der Lebensmittelkette fest. Validierungsuntersuchungen nach diesem Teil von ISO 16140 sollen von Organisationen durchgeführt werden, die an der Verfahrensvalidierung beteiligt sind.

Dieser Teil von ISO 16140 ist anwendbar auf die Validierung von Verfahren zur Untersuchung (Nachweis oder quantitative Bestimmung) von Mikroorganismen in:

- Erzeugnissen, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Erzeugnissen, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln;
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieser Teil von ISO 16140 gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte dieses Teils von ISO 16140 sind im Einzelfall auf andere (Mikro-)Organismen oder deren Metaboliten anwendbar. Zukünftig werden Anleitungen für andere Organismen (z. B. Viren und Parasiten) entweder in diesen oder einen anderen Teil von ISO 16140 aufgenommen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 16140-1, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16140-1.

4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung alternativer Verfahren

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst zwei Phasen:

- eine Verfahrensvergleichsuntersuchung des alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahrens anhand des Referenzverfahrens, durchgeführt im organisierenden Laboratorium;
- einen Ringversuch mit dem alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren im Vergleich zum Referenzverfahren, durchgeführt in verschiedenen Laboratorien.

Die technischen Regeln für die Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung und des Ringversuchs sind in Abschnitt 5 und Abschnitt 6 angegeben, je nachdem, ob es sich beim alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren um ein qualitatives oder quantitatives handelt. Die in einigen Teilen der Validierungsuntersuchung gewonnenen Daten werden unter Anwendung der sogenannten Zulässigkeitsgrenzen (*AL*, en: acceptability limits) bewertet und es wird keine statistische Auswertung der Daten durchgeführt. Diese *AL* basieren auf Gutachten und den in vorliegenden Validierungsuntersuchungen gewonnenen Daten.

5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung

5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung

5.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Verfahrensvergleichsuntersuchung ist der Teil des Validierungsprozesses, der im organisierenden Laboratorium durchgeführt wird. Sie besteht aus den folgenden drei Teilen:

- einer Vergleichsuntersuchung der Ergebnisse des Referenzverfahrens mit den Ergebnissen des alternativen Verfahrens bei (natürlich und/oder künstlich) kontaminierten Proben (sogenannte Untersuchung zur Empfindlichkeit);
- einer Vergleichsuntersuchung zur Bestimmung der relativen Nachweisgrenze (*RLOD*) in künstlich kontaminierten Proben (sogenannte *RLOD*-Untersuchung);
- einer Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität des alternativen Verfahrens.

Die Ergebnisse (Tabellen und Berechnungen) der verschiedenen Teile sowie die Auswertung der Ergebnisse, einschließlich widersprüchlicher Ergebnisse, müssen in einem Untersuchungsbericht angegeben werden.

Der Umfang der Untersuchungsproben (Prüfmengen) ist, wie in dem Referenzverfahren angegeben, zu verwenden.

5.1.2 Paarweise oder nicht paarweise Untersuchung

Das Referenz- und das alternative Verfahren müssen nach Möglichkeit an genau derselben Probe (derselben Untersuchungsprobe) durchgeführt werden. Es wird jedoch zwischen Untersuchungen unterschieden, in denen für das Referenz- und das alternative Verfahren dieselbe Untersuchungsprobe verwendet werden kann, weil beide Verfahren über genau den gleichen ersten Schritt im (Anreicherungs-)Verfahren verfügen, und Untersuchungen, in denen unterschiedliche Untersuchungsproben für das Referenz- und das alternative Verfahren verwendet werden müssen (z. B. aufgrund unterschiedlicher Anreicherungsbouillons). Wenn für beide Verfahren dieselbe Untersuchungsprobe verwendet wird, sind die Ergebnisse beider Verfahren eng miteinander verbunden. Wenn zum Beispiel eine Probe nicht kontaminiert ist, sollten beide Verfahren zu dem Ergebnis gelangen, dass die Probe negativ ist. Aufgrund dieses Zusammenhangs werden die vom Referenz- und vom alternativen Verfahren erzeugten Daten als **gepaart** oder abgestimmt bezeichnet. In diesem Teil von ISO 16140 wird für diese Art der Untersuchung die Formulierung „paarweise Untersuchung“ verwendet.

Der umgekehrte Fall, wenn kein gemeinsamer erster (Anreicherungs-)Schritt für das Referenz- und das alternative Verfahren vorhanden ist, ist auch möglich. In diesem Fall sind verschiedene Untersuchungsproben, die aus derselben Charge oder demselben Los eines Produkts stammen, für die beiden Verfahren zu verwenden und die sich ergebenden Daten werden als **ungepaart** oder nicht abgestimmt bezeichnet. In diesem Teil von ISO 16140 wird für diese Art der Untersuchung die Formulierung „nicht paarweise Untersuchung“ verwendet. Die Entscheidung, ob eine **paarweise** oder eine **nicht paarweise** Untersuchung vorliegt, hängt von den Arbeitsvorschriften für das Referenzverfahren und das alternative Verfahren ab. Wenn ein gemeinsamer Anfangsschritt in den (Anreicherungs-)Verfahren vorhanden ist, dann ist eine **paarweise** Untersuchung verbindlich vorgeschrieben.

Dieser Abschnitt beschreibt die Vergleichsuntersuchung, wenn das Referenz- und das alternative Verfahren einen gemeinsamen Anfangsschritt im (Anreicherungs-)Verfahren haben (**paarweise** Untersuchung), und für den Fall, dass das Referenz- und das alternative Verfahren keinen gemeinsamen ersten (Anreicherungs-)Schritt haben (**nicht paarweise** Untersuchung). Unterschiede zwischen beiden Arten von Untersuchungen sind gegebenenfalls im Text angeführt.

5.1.3 Untersuchung zur Empfindlichkeit

Die Untersuchung zur Empfindlichkeit zielt auf die Bestimmung der Unterschiede in den Empfindlichkeiten zwischen dem Referenz- und dem alternativen Verfahren ab. Die Untersuchung wird unter Verwendung natürlich und/oder künstlich kontaminierter Proben durchgeführt. In diesem Zusammenhang müssen verschiedene Kategorien und Arten untersucht werden. Die Zulässigkeitsgrenzen wurden für die höchste zulässige Differenz, abhängig von der Art der Untersuchung (paarweise/nicht paarweise) und der Anzahl der untersuchten Kategorien, festgelegt.

5.1.3.1 Auswahl von zu verwendenden Kategorien

Die Auswahl der bei der Validierung verwendeten Kategorien und Arten hängt von der Art oder Gruppe von Mikroorganismen und dem Anwendungsbereich der Validierung ab.

Falls das Verfahren auf ein breites Spektrum an Lebensmitteln anzuwenden ist, sind mindestens fünf Lebensmittelkategorien zu untersuchen. Im Bericht zur Validierungsuntersuchung müssen die in der Untersuchung verwendeten Lebensmittelkategorien angegeben werden. Wenn das Verfahren für eine begrenzte Anzahl von Lebensmittelkategorien zu validieren ist, z. B. „verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte“ und „wärmebehandelte Milch und Milchprodukte“, dann müssen nur diese Kategorien untersucht werden. Neben den Lebensmitteln können Futtermittelproben, Umgebungsproben und Proben aus dem Bereich der Primärproduktion als zusätzliche Kategorien einbezogen werden. Das erweitert die Anwendungsmöglichkeit des alternativen Verfahrens in Bezug auf diese zusätzlichen Kategorien.

Für alle gewählten Kategorien (Lebensmittel und andere) müssen mindestens drei verschiedene Arten je Kategorie in die Untersuchung einbezogen werden. In Anhang A ist eine Übersicht über die betreffenden Arten und Kategorien für einen speziellen Mikroorganismus angeführt, die für die Validierung von Bedeutung sein können. Anhang A sollte angewendet werden, um die Auswahl von Kategorien, Arten und Einheiten für den betroffenen speziellen Mikroorganismus zu erleichtern. Er sollte nicht als verbindlich vorgeschrieben betrachtet werden.

Bei der Auswahl von Proben für die Untersuchung ist es von höchster Wichtigkeit, solche Proben zu finden, die natürlich kontaminiert sind. Falls es nicht möglich ist, eine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Proben zu beschaffen, ist die künstliche Kontamination von Proben erlaubt (siehe Anhang B und Anhang C). Einzelheiten zur Vorbereitung der künstlich beimpften Proben sollten in dem Bericht zur Validierungsuntersuchung angegeben werden. Es ist wünschenswert, dass Lebensmittelproben aus einem möglichst großen Verbreitungsgebiet kommen, um eine mögliche systematische Abweichung aufgrund örtlich vorkommender Lebensmittelspezialitäten zu verringern und den Bereich der Validierung zu erweitern.

Es ist sicherzustellen, dass mit der Auswahl der verschiedenen Arten sowohl hohe als auch niedrige (natürliche) Gehalte an Begleitflora, verschiedene verarbeitungsbedingte Arten der Belastung (Stress) und rohe (nicht verarbeitete) Einheiten in die Untersuchung einbezogen sind.

BEISPIEL Für die Validierung eines Verfahrens zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in der Kategorie „verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte“ können die Arten (1) gekochte Fleischprodukte (geringer Gehalt an Begleitflora, Hitzestress), (2) fermentierte oder getrocknete Fleischprodukte (hoher Gehalt an Begleitflora, pH-Wertbedingter Stress) und (3) roh gepökelte (geräucherte) Fleischprodukte ($a_w < 0,92$) (mittlerer Gehalt an Begleitflora, durch den a_w -Wert bedingter Stress) verwendet werden.

In einigen Fällen, zum Beispiel bei einem alternativen Verfahren, das auf ein breites Spektrum an Lebensmittel anwendbar ist, ist es möglich, die Kategorien „verzehrfertig“ und „roh“ derselben Produktgruppe zu kombinieren. Zum Beispiel können die Kategorien rohes und verzehrfertiges Fleisch (Produkte) in einer Kategorie zusammengefasst werden, die drei Arten umfasst, die nach den betreffenden rohen und verzehrfertigen Lebensmittelarten aufgeteilt sind. Die Auswahl von (kombinierten) Lebensmittelkategorien sollte auf der Grundlage einer Risikoanalyse erfolgen.

5.1.3.2 Anzahl der Proben

Für jede zu untersuchende Kategorie müssen mindestens 60 einzelne Proben untersucht werden, bestehend aus mindestens drei Arten mit mindestens 20 Proben, die für jede Art repräsentativ sind (drei Arten $\times$ 20 Proben für jede Art = 60 Proben). Für jede untersuchte Art müssen entweder mit dem Referenzverfahren oder mit dem alternativen Verfahren teilweise positive Ergebnisse erhalten werden (d. h. die Proben sollten nicht alle positiv bzw. nicht alle negativ sein). Im Idealfall sollten je Art 10 untersuchte Proben (50 %) positiv und 10 negativ sein, die Anzahl sollte jedoch im Bereich von 25 % bis 75 % liegen. In jeder Kategorie müssen mindestens 30 Proben unter Anwendung des Referenzverfahrens und/oder des alternativen Verfahrens zu einem positiven Ergebnis führen.

5.1.3.3 Ergebnis und Bestätigung des alternativen Verfahrens

Viele Arbeitsvorschriften von alternativen Verfahren enthalten zwei Schritte. Der erste ist der Anreicherungs- und Nachweisschritt und der zweite die Bestätigung des Ergebnisses des Nachweises aus Schritt eins. Das Endergebnis des alternativen Verfahrens ist das Ergebnis nach Schritt zwei. Das Endergebnis entspricht dem Ergebnis aus dem Anreicherungs- und Nachweisschritt, wenn in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens kein Bestätigungsschritt enthalten ist.

Das (End-)Ergebnis des alternativen Verfahrens muss für den Teil der Untersuchung zur Empfindlichkeit bestätigt werden. Sämtliche mit dem alternativen Verfahren bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung erhaltenen Ergebnisse müssen bestätigt werden. Bei einer **paarweisen** Untersuchung müssen nur die mit dem alternativen Verfahren erhaltenen positiven Ergebnisse bestätigt werden, bei denen das zugehörige Ergebnis des Referenzverfahrens negativ war. Diese Bestätigung wird benötigt um zu bestimmen, ob das Ergebnis ein richtig positives oder falsch positives Ergebnis ist. Die Bestätigungsprüfung(en) muss (müssen) imstande sein als Ziel des Verfahrens das Isolat wiederzufinden und dessen Identität zu bestätigen. Diese Prüfung(en) kann (können) auf dem Bestätigungsverfahren des Referenzverfahrens, dem Bestätigungsschritt des alternativen Verfahrens im Falle, dass dieses Verfahren den Zielanalyten isolieren und dessen Identität bestätigen kann, einer Kombination aus beidem beruhen oder auf andere Weise, durch die der Zielanalyt isoliert und dessen Identität bestätigt werden kann, durchgeführt werden.

Wenn sich die Anreicherungen des Referenz- und alternativen Verfahrens voneinander in der Anzahl der Anreicherungen (z. B. primäre/nicht selektive und sekundäre/selektive) oder in der Gesamtdauer der Bebrütung unterscheiden, wird ein zusätzlicher Weg zur Bestätigung für die Validierungsuntersuchung benötigt. Der erste Weg muss darin bestehen, dass das alternative Verfahren entsprechend dessen Verfahrensweisen/Anweisungen (reguläre Prüfungsbedingungen des alternativen Verfahrens, nach den im Kit enthaltenden Verfahren; ohne die komplementären Prüfungen zu beinhalten, die während der Validierungsuntersuchung durchgeführt werden können) anzuwenden ist. Bei dem zweiten Weg muss ein

Teil der bebrüteten Anreicherungs­menge aus dem alternativen Verfahren an die des Referenzverfahrens abgeleitet werden, so dass zumindest die Gesamtdauer der Bebrütung der Anreicherung(en) von dem Referenzverfahren eingehalten wird. Die Ergebnisse der beiden Wege zur Bestätigung sind getrennt im Bericht anzugeben.

5.1.3.4 Berechnung und Auswertung hinsichtlich der Empfindlichkeit

Im Allgemeinen müssen die Daten in einem Bericht dargestellt werden, um einen Überblick über die erhaltenen Rohdaten zu erhalten. Es müssen Angaben zu der Art der Kontamination (natürlich kontaminiert oder künstlich kontaminiert) der verwendeten Proben, der Art des angewendeten Versuchsaufbaus (z. B. **paarweise** Untersuchung oder **nicht paarweise** Untersuchung) und der (den) angewendeten Bestätigungsprüfung(en), um das Ergebnis des alternativen Verfahrens zu bestätigen, gemacht werden. Bei künstlich kontaminierten Proben muss (der Verweis auf) das zur Herstellung angewendete Verfahren genau angegeben sein (siehe auch Anhang C).

Die erhaltenen Ergebnisse des Referenz- und des alternativen Verfahrens, die von derselben Probe stammen, das bedeutet von einer Untersuchungsprobe bei einer paarweisen Untersuchung oder von zwei Untersuchungsproben bei einer nicht paarweisen Untersuchung müssen bei einer **paarweisen** Untersuchung nach Tabelle 1 und bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung nach Tabelle 2 beschrieben werden. Tabelle 3 wird für die zusammengefassten Probenergebnisse für alle Kategorien je Kategorie (≥ 60 Proben) und Art (≥ 20 Proben) für sowohl **paarweise** als auch **nicht paarweise** Untersuchungen erstellt.

Tabelle 1 — Vergleich und Auswertung der Probenergebnisse zwischen den Referenz- und den alternativen Verfahren bei einer paarweisen Untersuchung

Ergebnis des (Referenz- oder alternativen) Verfahrens je Probe			
Referenz-verfahren	Alternatives Verfahren (einschließlich aller Bestätigungen, wie in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens beschrieben)	Bestätigtes alternatives Verfahren (auf beliebige Weise) ^a	Auswertung (basierend auf den Ergebnissen des bestätigten alternativen Verfahrens)
+	+	Nicht notwendig ^b	Positive Übereinstimmung (PA)
–	–	Nicht notwendig ^b	Negative Übereinstimmung (NA)
+	–	Nicht notwendig ^b	Negativabweichung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (ND)
–	+	+	Positivabweichung (PD)
–	+	–	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (NA) ^c
^a Die Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens erfolgt nach 5.1.3.3. ^b Kein Bedarf an zusätzlicher (zusätzlichen) Bestätigungsprüfung(en). Das Ergebnis des bestätigten alternativen Verfahrens entspricht dem Ergebnis des alternativen Verfahrens. ^c Dieses falsch-positive Ergebnis (FP) muss auch für die Berechnung der Falsch-positiv-Rate verwendet werden.			

Tabelle 2 — Vergleich und Auswertung der Probenergebnisse zwischen den Referenz- und den alternativen Verfahren bei einer nicht paarweisen Untersuchung

Ergebnis des (Referenz- oder alternativen) Verfahrens je Probe			
Referenz-verfahren	Alternatives Verfahren (einschließlich aller Bestätigungen, wie in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens beschrieben)	Bestätigtes alternatives Verfahren (auf beliebige Weise) ^a	Auswertung (basierend auf den Ergebnissen des bestätigten alternativen Verfahrens)
+	+	+	Positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)
+	+	–	Negativabweichung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (<i>ND</i>) ^b
–	–	–	Negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)
–	–	+	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (<i>NA</i>)
+	–	–	Negativabweichung (<i>ND</i>)
+	–	+	Negativabweichung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (<i>ND</i>)
–	+	+	Positivabweichung (<i>PD</i>)
–	+	–	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (<i>NA</i>) ^b
^a Die Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens erfolgt nach 5.1.3.3.			
^b Diese falsch-positiven Ergebnisse (<i>FP</i>) müssen auch für die Berechnung der Falsch-positiv-Rate verwendet werden.			

Tabelle 3 — Zusammenfassung der mit den Referenzverfahren und mit den alternativen Verfahren für alle Proben für jede Kategorie erhaltenen Ergebnisse

	Positives Ergebnis des Referenzverfahrens (R+)	Negatives Ergebnis des Referenzverfahrens (R–)
Positives Ergebnis des alternativen Verfahrens (A+)	+/+ Positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)	–/+ Positivabweichung (<i>PD</i>)
Negatives Ergebnis des alternativen Verfahrens (A–)	+/– Negativabweichung (<i>ND</i>)	–/– Negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)

Auf der Grundlage der in Tabelle 3 für die kombinierten Kategorien je Kategorie und Art zusammengefassten Ergebnisse werden die Werte für die Empfindlichkeit des alternativen Verfahrens (1) und des Referenzverfahrens (2) sowie die relative Richtigkeit (3) und falsch-positiv-Rate für das alternative Verfahren nach der zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse (4) wie folgt berechnet:

$$\text{Empfindlichkeit für das alternative Verfahren: } SE_{\text{alt}} = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{Empfindlichkeit für das Referenzverfahren: } SE_{\text{ref}} = \frac{(PA + ND)}{(PA + ND + PD)} \times 100 \% \quad (2)$$

$$\text{Relative Richtigkeit: } RT = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (3)$$

$$\text{Falsch – positiv – Rate für das alternative Verfahren: } FPR = \frac{FP}{NA} \times 100 \% \quad (4)$$

Dabei ist

N die Gesamtanzahl der Proben ($NA + PA + PD + ND$);

FP die falsch positiven Ergebnisse.

Hinsichtlich einer Erläuterung der verwendeten Abkürzungen siehe Tabelle 1 bis Tabelle 3.

Die Ergebnisse des bestätigten alternativen Verfahrens müssen verwendet werden um zu bestimmen, ob das alternative Verfahren zu Ergebnissen führt, die mit denen des Referenzverfahrens vergleichbar sind.

Sowohl bei **paarweisen** als auch **nicht paarweisen** Untersuchungen wird die Differenz zwischen ($ND - PD$) und bei **paarweisen** Untersuchungen die Summe von ($ND + PD$) berechnet. Es wird überprüft, ob die Differenz und/oder die Summe aus PD und ND der in Tabelle 4 in Bezug auf die Art der Untersuchung (**paarweise** oder **nicht paarweise**) und die Anzahl der bei der Bewertung verwendeten Kategorien angeführten Zulässigkeitsgrenze (AL) entsprechen.

ANMERKUNG Die Zulässigkeitsgrenzen (AL) beruhen auf Daten und Konsens-Gutachten. Die AL beruhen nicht auf einer statistischen Auswertung der Daten.

Die Auswertung der Ergebnisse muss je Kategorie und für alle in der Validierungsuntersuchung verwendeten Kategorien erfolgen. Falls bei unterschiedlichen Probenarten unterschiedliche Arbeitsvorschriften für die Anreicherung angewendet werden, muss außerdem eine Auswertung der Ergebnisse für jede Arbeitsvorschrift erfolgen. Die AL wird nicht eingehalten, wenn der beobachtete Wert größer als die AL ist. Wird die AL nicht eingehalten, sollten Untersuchungen (z. B. Ursachenanalyse) durchgeführt werden, um die beobachteten Ergebnisse zu erklären. Auf der Grundlage der AL und der zusätzlichen Angaben wird entschieden, ob das alternative Verfahren als nicht gebrauchstauglich für die betreffende(n) Kategorie oder Kategorien anzusehen ist. Die Gründe für die Annahme des alternativen Verfahrens bei Nichteinhaltung der AL müssen im Untersuchungsbericht angegeben werden.

Tabelle 4 — Parameter der Zulässigkeitsgrenze und Werte für eine paarweise und eine nicht paarweise Untersuchung in Bezug auf die Anzahl der verwendeten Kategorien

Anzahl der Kategorien	Paarweise Untersuchung		Nicht paarweise Untersuchung
	$(ND^a - PD^b)$	$(ND + PD)$	$(ND - PD)$
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

^a ND = Anzahl der Proben mit Ergebnissen mit Negativabweichung
^b PD = Anzahl der Proben mit Ergebnissen mit Positivabweichung

ANMERKUNG Angaben zu den zwischen Ergebnissen des alternativen Verfahrens vor und nach der Bestätigung der Ergebnisse (Schritt 1 und Schritt 2) nach der Arbeitsvorschrift für das alternative Verfahren beobachteten Unterschieden sollten im Validierungsbericht als zusätzliche Angaben angeführt werden, sie werden jedoch nicht in der Gesamtbeurteilung der Leistung des alternativen Verfahrens verwendet.

5.1.4 Untersuchung zur relativen Nachweisgrenze

Zur Bewertung der Nachweisgrenze (LOD) des alternativen Verfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren wird eine Vergleichsuntersuchung durchgeführt. Die Bewertung beruht auf der Berechnung der relativen Nachweisgrenze ($RLOD$). In der Untersuchung werden Parallelproben von künstlich kontaminierten Proben bei drei oder mehr Konzentrationen der Kontamination verwendet. Die Konzentrationen sollten vorzugsweise bekannt sein, da das die Berechnung der LOD ermöglicht. Es ist jedoch nicht erforderlich.

5.1.4.1 Auswahl der Kategorien und Anzahl von untersuchten Proben und Parallelproben

Hinsichtlich der Auswahl von Kategorien und Arten siehe 5.1.3.1. Es werden die gleichen Kategorien verwendet, die auch für die Untersuchung zur Empfindlichkeit (siehe 5.1.3) gewählt wurden. Für jede Kategorie wird eine relevante Art gewählt. Um die bewertete Kategorie besser darzustellen, sollte sich diese Art (wenn möglich) von den in der Untersuchung zur Empfindlichkeit verwendeten Arten unterscheiden. Die Proben müssen künstlich beimpft werden. Verfahren zur Herstellung von künstlich beimpften Proben sind in Anhang C angeführt. Jede Art wird mit einem anderen Stamm beimpft.

Je Art werden mindestens drei Konzentrationen hergestellt, die mindestens eine Konzentration als Negativkontrolle, eine geringe und eine höhere Konzentration umfassen. Idealerweise muss die geringe Konzentration die theoretische Erfassungsgrenze (d.h. 0,7 KBE je Prüfmenge) sein und die höhere Konzentration gerade oberhalb der theoretischen Erfassungsgrenze (z. B. 1 KBE bis 1,5 KBE je Prüfmenge) liegen. Mindestens die geringe Konzentration sollte bei dem Referenzverfahren zu einer teilweisen Wiederfindung führen (die teilweise Wiederfindung bei der geringen Konzentration sollte zwischen 25 % und 75 % der Anzahl der untersuchten Proben liegen). Ein Schätzwert für die Konzentration der Kontamination (mit Ausnahme der Negativkontrolle) sollte ermittelt werden. Bei der Konzentration der Negativkontrolle sollten mit beiden Verfahren mindestens fünf Parallelproben untersucht werden. Bei der zweiten (geringen) Konzentration (theoretische Erfassungsgrenze) sollten mindestens 20 und bei der dritten (höheren) Konzentration mindestens fünf Parallelproben mit beiden Verfahren untersucht werden. Die Konzentration der Negativkontrolle darf nicht zu positiven Ergebnissen führen. Werden positive Ergebnisse erhalten, sind die Versuche für alle Konzentrationen zu wiederholen.

Mit dem alternativen Verfahren erhaltene positiv abweichende Untersuchungsergebnisse müssen zusätzlich bestätigt werden (siehe 5.1.3.3). Die *RLOD* muss nach der Bestätigung bewertet werden.

ANMERKUNG 1 Um besser sicherzustellen, dass eine teilweise Wiederfindung erreicht wird, können mehr Konzentrationen der Kontamination hergestellt und untersucht werden.

ANMERKUNG 2 Wenn das alternative Verfahren eine geringere *LOD* hat als das Referenzverfahren, hat die benötigte Konzentration der Kontamination die *LOD* des Referenzverfahrens zum Ziel.

5.1.4.2 Berechnung und Auswertung der *RLOD*

Die *RLOD* ist definiert als das Verhältnis der *LOD* des alternativen Verfahrens und des Referenzverfahrens:

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}} \quad (5)$$

Für jede Kategorie müssen mindestens die *RLOD* durch Anpassung eines komplementären log-log-Modells (en: complementary-log-log, CLL) an die kombinierten Daten zu Nichtvorhandensein/Vorhandensein beider Verfahren als Funktion des Verfahrens geschätzt werden. Die Konzentrationen der Kontamination werden für die Berechnungen der *RLOD* nicht benötigt, da sie im Modell enthalten sind, was zu Kurven führt, die die Nachweiswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis (Konzentration der Kontamination) darstellen. Das statistische Modell und die Berechnungen sind in Anhang D ausgearbeitet. Die Berechnungen können mit der Excel^{®1)}-Tabellenkalkulation dieses Teils von ISO 16140 durchgeführt werden. Die Excel[®]-Tabellenkalkulation zur Berechnung der *RLOD*-Werte steht unter <http://standards.iso.org/iso/16140> kostenlos zum Herunterladen zur Verfügung; anschließend ist die *RLOD*-Datei auszuwählen. Für Berechnungen unter Anwendung dieser Excel[®]-Tabellenkalkulation ist die Option „unbekannte Konzentration“ zu verwenden. Für jede Einheit *i* wird die *RLOD_i* berechnet. Die Ergebnisse werden wie in Tabelle 5 dargestellt erfasst.

Tabelle 5 — Darstellung der *RLOD* vor und nach der Bestätigung der Ergebnisse des alternativen Verfahrens

	<i>RLOD</i> unter Verwendung der Ergebnisse des alternativen Verfahrens	<i>RLOD</i> unter Verwendung der Ergebnisse des bestätigten alternativen Verfahrens
Einheit (Kategorie) (<i>i</i>)	<i>RLOD_i</i>	<i>RLOD_i</i>
1		
2		
...		
<i>k</i>		
Kombiniert		

Eine Zulässigkeitsgrenze (*AL*) für die *RLOD* auf der Grundlage der Ergebnisse des bestätigten alternativen Verfahrens legt die maximale Zunahme der *LOD* des alternativen Verfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren fest, die bei der Betrachtung der Gebrauchstauglichkeit des Verfahrens nicht als bedeutend angesehen wird. Folglich wird *AL* ein Wert von > 1 sein. Die Auswertung sollte für jede Einheit erfolgen.

- 1) Excel ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO.

Die *AL* für Daten einer **paarweisen** Untersuchung wird auf 1,5 festgelegt, was bedeutet, dass die *LOD* des alternativen Verfahrens nicht mehr als das 1,5-Fache größer sein darf als die *LOD* des Referenzverfahrens. Ein *LOD*-Wert für das alternative Verfahren, der kleiner ist als der *LOD*-Wert des Referenzverfahrens, wird immer angenommen, weil das bedeutet, dass mit dem alternativen Verfahren wahrscheinlich geringere Konzentrationen der Kontamination nachgewiesen werden als mit dem Referenzverfahren.

Die *AL* für Daten einer **nicht paarweisen** Untersuchung wird auf 2,5 festgelegt, was bedeutet, dass die *LOD* des alternativen Verfahrens nicht mehr als das 2,5-Fache größer sein darf als die *LOD* des Referenzverfahrens. Ein *LOD*-Wert für das alternative Verfahren, der kleiner ist als der *LOD*-Wert des Referenzverfahrens, wird immer angenommen, weil das bedeutet, dass mit dem alternativen Verfahren wahrscheinlich geringere Konzentrationen der Kontamination nachgewiesen werden als mit dem Referenzverfahren.

Die *AL* wird nicht eingehalten, wenn der beobachtete Wert größer als die *AL* ist. Wird die *AL* nicht eingehalten, sollten Untersuchungen (z. B. Ursachenanalyse) durchgeführt werden, um die beobachteten Ergebnisse zu erklären. Auf der Grundlage der *AL* und der zusätzlichen Angaben wird entschieden, ob das alternative Verfahren als nicht gebrauchstauglich für die betreffende Einheit oder Kategorie anzusehen ist. Die Gründe für die Annahme des alternativen Verfahrens bei Nichteinhaltung der *AL* müssen im Untersuchungsbericht angegeben werden.

Neben der Berechnung der *RLOD* dürfen die Daten unter Anwendung des in Literaturhinweis [14] beschriebenen und in den Validierungsleitlinien der AOAC [6] enthaltenen Nachweiswahrscheinlichkeitsmodells (*POD*-Modells) der AOAC bewertet werden. Die Bewertung unter Anwendung des *POD*-Modells kann zusätzliche Informationen zur Gleichwertigkeit der Verfahren liefern.

5.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und zur Exklusivität

5.1.5.1 Auswahl und Anzahl von Prüfstämmen

Es ist ein Spektrum von Stämmen zu verwenden. Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang E angegeben. Die verwendeten Stämme sollten das Messprinzip des alternativen Verfahrens (z. B. kulturbasiert, Immunoassay-basiert und molekular) berücksichtigen. Verschiedene Messprinzipien erfordern möglicherweise die Verwendung verschiedener Prüflisten von Stämmen.

Jeder verwendete Stamm muss ausreichend detailliert biochemisch, serologisch und/oder genetisch charakterisiert sein, damit seine Identität bekannt ist. Die verwendeten Stämme sollten unter Berücksichtigung des Anwendungsbereichs der Validierung vorzugsweise aus Lebensmitteln, Futtermitteln, der Umgebung bei der Lebensmittelherstellung oder dem Bereich der Primärproduktion isoliert worden sein. Es können jedoch auch klinische Stämme, Umweltstämme und Stämme aus Kultursammlungen verwendet werden. Die ursprüngliche Quelle aller Isolate sollte bekannt sein und sie sollten in einer örtlichen (z. B. Expertenlaboratorium), nationalen oder internationalen Kultursammlung aufbewahrt werden, damit sie bei Bedarf in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden können.

Bei der Untersuchung zur Inklusivität müssen mindestens 50 Reinkulturen von (Ziel-)Mikroorganismen untersucht werden. Bei der Untersuchung zur Inklusivität im Fall von Verfahren für Salmonellen müssen mindestens 100 Reinkulturen verschiedener Serotypen von *Salmonella* untersucht werden.

Bei der Untersuchung zur Exklusivität müssen mindestens 30 Reinkulturen von (Nicht-Ziel-)Mikroorganismen untersucht werden.

Einige Mikroorganismen sind schwer oder nicht kultivierbar, wie z. B. Viren oder protozoische Parasiten. Wenn der Zielorganismus nicht kultiviert werden kann, sollten zum Aufstocken im frühesten geeigneten Schritt des Verfahrens reine Suspensionen der Prüfstämme verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Bei einigen Mikroorganismen ist es schwierig, die geforderte Anzahl von Stämmen für die Inklusivität und Exklusivität zu erhalten. In diesen Fällen sollte von den an der Validierungsuntersuchung beteiligten Seiten ein vereinbarter Satz von Prüfstämmen ausgewählt werden.

ANMERKUNG 2 Anleitungen zur Konservierung und Erhaltung von Stämmen in (örtlichen) Sammlungen sind in ISO 11133 [2] enthalten.

5.1.5.2 Beimpfen mit Zielstämmen (Inklusivität)

Jede Untersuchung wird einmal und nur mit dem alternativen Verfahren durchgeführt (einschließlich eines Bestätigungsschrittes, wenn er in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens vorgeschrieben ist). Das Beimpfen eines geeigneten Wachstumsmediums erfolgt mit einer Verdünnung einer Reinkultur jedes Prüfstamms. Diese Kultur wird zur Untersuchung der Inklusivität verwendet. Es wird keine Probe hinzugefügt.

Die Reinkultur sollte in einer nicht selektiven Bouillon unter optimalen Wachstumsbedingungen vermehrt werden, um in der stationären Phase hohe Zellpopulationen zu erhalten. Die Beimpungskonzentration muss 10-mal bis 100-mal größer sein als die kleinste Erfassungsgrenze des zu validierenden alternativen Verfahrens und die Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens muss einschließlich aller in den Anweisungen des alternativen Verfahrens ausführlich dargelegten Sachverhalte (Anreicherungen) angewendet werden. Wenn das alternative Verfahren mehr als eine Arbeitsvorschrift (zur Anreicherung) einschließt (z. B. für verschiedene Probenarten), dann ist die anspruchsvollste Vorschrift mit der vollständigen Liste der Prüfstämme anzuwenden. Wenn negative oder zweifelhafte Ergebnisse erhalten werden, sollte die Untersuchung wiederholt werden, wobei das Referenzverfahren einzubeziehen ist, um zu überprüfen, ob der Stamm mit dem geeigneten Referenzverfahren nachgewiesen werden könnte. Wenn die Ergebnisse negativ sind, kann in Betracht gezogen werden, die Untersuchung unter Zugabe einer Lebensmitteleinheit zu wiederholen. Wenn die alternative Arbeitsvorschrift einen Bestätigungsschritt einschließt, müssen Bestätigungsprüfungen in die Untersuchung der ausgewählten Stämme einbezogen werden.

5.1.5.3 Beimpfen mit Nicht-Zielstämmen (Exklusivität)

Jede Untersuchung wird einmal und nur mit dem alternativen Verfahren durchgeführt (einschließlich eines Bestätigungsschrittes, wenn er in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens vorgeschrieben ist). Das Beimpfen des geeigneten Wachstumsmediums erfolgt mit einer Verdünnung einer Reinkultur jedes Prüfstamms. Diese Kultur wird zur Untersuchung der Exklusivität verwendet. Es wird keine Probe hinzugefügt.

Die Reinkultur sollte in einer nicht selektiven Bouillon unter optimalen Wachstumsbedingungen vermehrt werden, um in der stationären Phase hohe Zellpopulationen zu erhalten. Wenn das Verfahren vor einem Nachweisschritt ein Wachstum in einem selektiven Medium einschließt, dann sollte zum Zweck der Untersuchung der Exklusivität das selektive Medium durch ein nicht selektives Medium ersetzt werden. Wenn mit dem alternativen Verfahren positive oder zweifelhafte Ergebnisse erhalten werden, sollte die Untersuchung wiederholt werden, wobei die vollständige in den Anweisungen des alternativen Verfahrens empfohlene Arbeitsvorschrift (zur Anreicherung) Anwendung findet, unter Verwendung selektiver Anreicherungen, wenn diese in den Anweisungen vermerkt sind. Wenn das alternative Verfahren mehr als eine Art der Anreicherung einschließt (z. B. für verschiedene Probenarten), dann sollte jede davon mit der vollständigen Liste der Prüfstämme angewendet werden. Außerdem sollte das Referenzverfahren angewendet werden, um zu prüfen, dass der Stamm nicht mit dem Referenzverfahren nachgewiesen werden kann.

5.1.5.4 Angabe und Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden nach Tabelle 6 erfasst. Die Auswertung muss durch das mit der Verfahrensvergleichsuntersuchung beauftragte Laboratorium erfolgen. Im Bericht sollten alle Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen angeführt werden.

Tabelle 6 — Darstellung der Ergebnisse für die Inklusivität und Exklusivität

Mikroorganismen	Alternatives Verfahren	
	Untersuchungsergebnis	Bestätigtes Ergebnis
Inklusivität (Zielstämme)		
1		
2		
usw.		
Exklusivität (Nicht-Zielstämme)		
1		
2		
usw.		

5.2 Ringversuch

5.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Das Ziel des Ringversuches ist die Bestimmung des Unterschiedes in der Empfindlichkeit zwischen dem Referenz- und dem alternativen Verfahren bei der Prüfung durch verschiedene Teilnehmer unter Verwendung identischer Proben (Vergleichbedingungen). Die Bedingungen bei der Durchführung des Ringversuchs sollten die normalen, von den einzelnen Teilnehmern angewendeten Bedingungen, um die Vergleichbedingungen weitestgehend zu erfüllen, möglichst genau widerspiegeln. Der Unterschied zwischen **paarweisen** und **nicht paarweisen** Untersuchungen ist im Text angezeigt. Es erfolgt jedoch keine Teilung in getrennte Abschnitte, da die Auswirkung auf die Untersuchungsvorschrift und die Auswertung der Daten begrenzt ist. Der Ringversuch wird vom organisierenden Laboratorium geleitet.

Die Ergebnisse (Tabellen und Berechnungen) der verschiedenen Teile und die Auswertung der Ergebnisse, einschließlich unstimmiger Ergebnisse, müssen in einem Untersuchungsbericht angeführt werden.

5.2.2 Untersuchungsvorschrift

Der Ringversuch muss zu mindestens 10 gültigen Datensätzen von mindestens 10 Teilnehmern führen. Die Teilnehmer müssen aus mindestens fünf verschiedenen Organisationen, vorzugsweise jedoch 10 Organisationen, stammen, wobei das organisierende Laboratorium ausgenommen ist. Von einer Organisation können höchstens drei Datensätze erzeugt werden. Facharbeiter (Techniker), die an der Vorbereitung der im Ringversuch verwendeten Proben beteiligt waren, dürfen nicht an der Untersuchung dieser Proben im Rahmen des Ringversuchs teilnehmen.

ANMERKUNG Laboratorien an unterschiedlichen Standorten, die jedoch zu einem Unternehmen oder Institut gehören, werden als verschiedene Organisationen zugelassen.

Es gilt folgende Arbeitsvorschrift:

- In den Fällen, in denen für das alternative Verfahren unterschiedliche Arbeitsvorschriften (für die Anreicherung) vorliegen, muss eine anspruchsvolle Vorschrift (für die Anreicherung) gewählt werden, z. B. die Vorschrift mit der kürzesten Bebrütungsdauer oder mit besonders selektiven Bedingungen. Die gewählte Einheit muss für die gewählte Vorschrift relevant sein. Diese relevante Einheit (hinsichtlich der Auswahl siehe Anhang A), die zur Herstellung der Untersuchungsproben verwendet wird, sollte eine natürliche Begleitflora enthalten;

- Die Einheit ist mit dem Zielkeim zu beimpfen. Die Arbeitsvorschrift für das Beimpfen der Proben muss für die ausgewählte Einheit geeignet sein. Die Proben müssen vom organisierenden Laboratorium vorbereitet werden, um die Homogenität zwischen den Proben sicherzustellen; dabei sind die in Anhang B und Anhang C enthaltenen Vorschriften zur Vorbereitung anzuwenden;
- Es sind mindestens drei verschiedene Konzentrationen der Kontamination zu verwenden: eine Negativkontrolle (L_0) und zwei Konzentrationen (L_1 und L_2). Mindestens eine davon sollte zu teilweise positiven Ergebnissen führen. Die Konzentration der Kontamination, die für eine teilweise Wiederfindung benötigt wird, muss auf den Daten aus der Untersuchung zur *RLOD* des Referenzverfahrens in der Vergleichsuntersuchung beruhen. Theoretisch ist eine mittlere Konzentration der Kontamination von 1 KBE/Probe angemessen, um eine teilweise Wiederfindung zu erreichen;
- Für jede Konzentration der Kontamination werden von jedem Teilnehmer mindestens acht Parallelblindproben mit beiden Verfahren untersucht; daraus ergeben sich insgesamt mindestens 48 Ergebnisse (acht Wiederholungsuntersuchungen $\times$ drei Konzentrationen $\times$ zwei Verfahren) je Teilnehmer;
- Bei Untersuchungen, die zu gepaarten Ergebnissen führen [gepaarte Ergebnisse treten auf, wenn der erste (Anreicherungs-)Schritt bei dem alternativen Verfahren und dem Referenzverfahren gleich ist], ist eine Probe erforderlich, um ein Ergebnis für das alternative und das Referenzverfahren zu erhalten. Bei Untersuchungen, die zu **ungepaarten** Ergebnissen führen [**ungepaarte** Ergebnisse treten auf, wenn das alternative Verfahren und das Referenzverfahren mit unterschiedlichen ersten (Anreicherungs-)Schritten beginnen], sind verschiedene Untersuchungsproben von der gleichen Probe erforderlich. Eine Untersuchungsprobe wird mit dem alternativen Verfahren untersucht und eine andere mit dem Referenzverfahren;
- Die Daten werden in zwei Tabellen angegeben. In der ersten werden die Ergebnisse des Referenzverfahrens angeführt und in der zweiten die Ergebnisse des alternativen Verfahrens vor und nach der Bestätigung der Ergebnisse. Wenn die Ergebnisse für das alternative und das Referenzverfahren von derselben anfänglichen (Anreicherungs-)Bouillon erhalten wurden (**gepaarte** Daten), dann bestätigt die Bestätigung des Referenzverfahrens auch das alternative Verfahren. Wenn das Referenzverfahren zu einem negativen Ergebnis führt und das alternative Verfahren zu einem positiven Ergebnis, dann ist eine Bestätigung des positiven Ergebnisses erforderlich. Wenn die Ergebnisse für das alternative und das Referenzverfahren von verschiedenen (Anreicherungs-)Schritten erhalten wurden (**ungepaarte** Daten), dann müssen alle mit dem alternativen Verfahren erhaltenen Ergebnisse zur Bestätigung weitergeführt werden. Das Verfahren zur Bestätigung sollte in der Arbeitsvorschrift der Untersuchung enthalten sein und es muss in der Lage sein als Ziel des Verfahrens das Isolat wiederzufinden und dessen Identität zu bestätigen;
- Das organisierende Laboratorium kann darauf hinweisen, dass Bouillons, Platten und/oder Isolate für einen bestimmten Zeitraum aufbewahrt werden müssen, damit bei Bedarf von einem Teilnehmer erhaltene Ergebnisse bestätigt werden können;
- Die Untersuchung der Proben ist von jedem Teilnehmer zum festgelegten Datum durchzuführen;
- In beiden Fällen ist die Kombination „Anzahl der Konzentrationen der Kontamination/Anzahl der Mehrfachuntersuchungen/Anzahl der Laboratorien ohne Ausreißer“ so zu wählen, dass mindestens 480 Ergebnisse (240 für jedes Verfahren) zur Verwendung in den Berechnungen für jedes Verfahren erhalten werden.

Das organisierende Laboratorium muss unter Verwendung aller aufgezeichneten Daten festlegen, welche Ergebnisse für die Verwendung in der Datenanalyse geeignet sind. Das organisierende Laboratorium muss die Rohdaten und andere im Erfassungsbogen geforderten Angaben untersuchen um sicherzustellen, dass alle Teilnehmer die Untersuchungen in Übereinstimmung sowohl mit dem alternativen Verfahren als auch dem Referenzverfahren, beide in Schriftform vorliegend, durchgeführt haben. Wenn Anzeichen dafür

vorliegen, dass die Ergebnisse möglicherweise unter ungeeigneten Bedingungen erhalten wurden und/oder die Verfahren nicht genauestens eingehalten wurden, werden diese oder alle Ergebnisse des Teilnehmers von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Nach Abschluss des Ringversuchs müssen alle Angaben auf den Erfassungsbögen und die Ergebnisse dem organisierenden Laboratorium vorgelegt und wie folgt untersucht werden:

- Daten der Teilnehmer sind zu verwerfen, wenn die Beförderungsbedingungen und -zeiten außerhalb der festgelegten zulässigen Toleranzen liegen (die Grenzwerte für Transportdauer und -temperatur müssen vor dem Versand der Proben festgelegt werden);
- Daten von Teilnehmern, die Proben/Testkits usw. erhalten haben, die während des Transports beschädigt wurden, sind zu verwerfen;
- Daten von Teilnehmern, die Medienzusammensetzungen verwenden, die nicht dem (Referenz-)Verfahren entsprechen, sind zu verwerfen;
- Daten von Teilnehmern sind zu verwerfen, wenn die Angaben auf dem Erfassungsbogen nahelegen, dass das Laboratorium entweder von der Standardarbeitsanweisung oder von den entscheidenden Betriebsbedingungen abgewichen ist.

5.2.3 Berechnungen und Zusammenfassung der Daten

Die von den einzelnen Teilnehmern im Ringversuch erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 7 — Positive Ergebnisse mit dem Referenzverfahren

Teilnehmer	Konzentration der Kontamination		
	L_0	L_1	L_2
Teilnehmer 1	/8 ^a	/8 ^b	/8 ^c
Teilnehmer 2	/8	/8	/8
Teilnehmer 3	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8
Gesamt	P_0	P_1	P_2
^a Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 0. ^b Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 1. ^c Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 2.			

Tabelle 8 — Positive Ergebnisse (vor und nach der Bestätigung) mit dem alternativen Verfahren

Teilnehmer	Konzentration der Kontamination					
	L_0		L_1		L_2	
Teilnehmer 1	/8 ^a	/8 ^b	/8 ^c	/8 ^d	/8 ^e	/8 ^f
Teilnehmer 2	/8	/8	/8	/8	/8	/8
Teilnehmer 3	/8	/8	/8	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8	/8	/8	/8
Gesamt	P_0	CP_0	P_1	CP_1	P_2	CP_2
^a Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 0. ^b Anzahl der bestätigten Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 0. ^c Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 1. ^d Anzahl der bestätigten Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 1. ^e Anzahl der positiven Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 2. ^f Anzahl der bestätigten Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 2.						

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Konzentration L_0 wird die prozentuale Spezifität (SP) des Referenzverfahrens sowie des alternativen Verfahrens unter Verwendung der Daten nach einer Bestätigung wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifität des Referenzverfahrens: } SP_{\text{ref}} = \left[1 - \left(\frac{P_0}{N_-} \right) \right] \times 100 \% \quad (6)$$

$$\text{Spezifität des alternativen Verfahrens: } SP_{\text{alt}} = \left[1 - \left(\frac{CP_0}{N_-} \right) \right] \times 100 \% \quad (7)$$

Dabei ist

N_- die Anzahl aller Untersuchungen von L_0 ;

P_0 die Gesamtanzahl der falsch positiven Ergebnisse, die mit den Leerwertproben vor der Bestätigung erhalten wurden.

CP_0 die Gesamtanzahl der falsch positiven Ergebnisse, die mit den Leerwertproben erhalten wurden.

Die Ergebnisse von allen Teilnehmern sind für jede der Konzentrationen L_1 und L_2 bei einer **paarweisen** Untersuchung in Tabelle 9 und bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung in Tabelle 10 zusammengefasst. Tabelle 11 wurde für die zusammengefassten Daten von allen Teilnehmern sowohl bei einer **paarweisen** als auch bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung erstellt.

Tabelle 9 — Zusammengefasste Ergebnisse für alle Teilnehmer bei einer paarweisen Untersuchung

Ergebnis des (Referenz- oder alternativen) Verfahrens je Probe			
Referenzverfahren n	Alternatives Verfahren ^a	Bestätigtes alternatives Verfahren ^b	Auswertung (basierend auf den Ergebnissen des bestätigten alternativen Verfahrens)
+	+	Nicht notwendig ^c	Positive Übereinstimmung (PA)
–	–	Nicht notwendig ^c	Negative Übereinstimmung (NA)
+	–	Nicht notwendig ^c	Negativabweichung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (ND)
–	+	+	Positivabweichung (PD)
–	+	–	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (NA) ^d

^a Die Ergebnisse des alternativen Verfahrens schließen alle in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens beschriebenen Bestätigungen ein.

^b Das Ergebnis des bestätigten alternativen Verfahrens ist das Ergebnis nach einer zusätzlichen Bestätigung, wie in der Arbeitsvorschrift für die Validierungsuntersuchung beschrieben.

^c Kein Bedarf an zusätzlicher (zusätzlichen) Bestätigungsprüfung(en). Das Ergebnis des bestätigten alternativen Verfahrens entspricht dem Ergebnis des alternativen Verfahrens.

^d Dieses falsch-positive Ergebnis (FP) muss auch für die Berechnung der Falsch-positiv-Rate verwendet werden.

Tabelle 10 — Zusammengefasste Ergebnisse für alle Teilnehmer bei einer nicht paarweisen Untersuchung

Ergebnis des (Referenz- oder alternativen) Verfahrens je Probe			
Referenz- verfahren	Ergebnis des alternativen Verfahrens ^a	Bestätigtes alternatives Verfahren ^b	Auswertung (basierend auf den Ergebnissen des bestätigten alternativen Verfahrens)
+	+	+	Positive Übereinstimmung (PA)
+	+	–	Negativabweichung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (ND) ^c
–	–	–	Negative Übereinstimmung (NA)
–	–	+	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (NA)
+	–	–	Negativabweichung (ND)
+	–	+	Negativabweichung aufgrund falsch negativer Ergebnisse des alternativen Verfahrens (ND)
–	+	+	Positivabweichung (PD)
–	+	–	Negative Übereinstimmung aufgrund falsch positiver Ergebnisse des alternativen Verfahrens (NA) ^c

^a Die Ergebnisse des alternativen Verfahrens schließen alle in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens beschriebenen Bestätigungen ein.

^b Das Ergebnis des bestätigten alternativen Verfahrens ist das Ergebnis nach einer zusätzlichen Bestätigung, wie in der Arbeitsvorschrift für die Validierungsuntersuchung beschrieben.

^c Dieses falsch-positive Ergebnis (FP) muss auch für die Berechnung der Falsch-positiv-Rate verwendet werden.